



## 「1個」を見る

慶應義塾大学 理工学部 物理学科 佐瀬一郎, 吉川 博  
宮田英威, 木下一彦

Every element of life, at all levels of hierarchy down to a single molecule, is a functional entity that by itself performs a delicate task(s). Understanding of the mechanism of biological machinery therefore requires a close observation of the performance of individual cells, organelles, or molecules. Three examples are presented, in which single-cell or single-molecule observation under an optical microscope was crucial in the analysis: ionic regulation of the acrosome reaction in starfish sperm revealed by multi-view microscopy, elucidation of elementary steps of actomyosin motors using optical tweezers, and detection of molecular rotation via single fluorophore imaging.

optical microscopy / acrosome reaction / molecular motor / optical tweezers /  
single-fluorophore imaging / fluorescence polarization

### 1. はじめに

顕微鏡を覗いて「見たり」「いじったり」が趣味の我々にとって、本特集の「イメージング」という言葉は少々冷たく響く。といってもサイエンスにはやはり、1ヶ所に集中しがちな視線より、隅から隅まで忠実に記録していく「イメージング」がふさわしい。

空間・時間分解能をあわせ持つ光学顕微鏡の下でのイメージングの真髄は、異なる細胞、種々の細胞内器官、さらには異なる分子を1個1個見分け、システム全体の中でそれぞれがどのように振る舞うか、互いにいつどのように連絡・連携するかを、見極めることであろう。多くの測定法が分離・精製された均一試料（まったく同じ「個」の集団）を要求するのに対し、ヘテロな複合システムの中での異なる「個」を全部同時に、しかもそれぞれちゃんと区別して、観察するのがイメージングである。

という前置きに逆らって、本稿では、たった1個に視線を集中することの意義を追求してみたい。とくに、均一なはずの試料が相手のときでも、丸ごと測定するのではなく、その中の1個だけに注目することが大切で

あることを、実例で示したい。生き物は、個体から始まって分子のレベルまでどれだけ階層を下っても、かならず各要素がそれぞれ1個だけで立派な仕事をする。物理学が得意とする「塗りつぶした描像」のあてはまりにくい、「個」が主役の世界である。その「個」の働きをとらえるには、やはり1個を見るしかないのである。

### 2. 精子先体反応のイオン制御

#### 一懸濁液中では見えなかったもの一

精子が卵表面に到達すると、精子は卵子との融合の準備として「先体反応 (acrosome reaction)」を起こす。図1のマンガに示すように、精子頭部の先端内側にある膜小胞 (図のダルマ型の精子頭部の内側の小さな円) が精子を包む細胞膜と融合し、あたかも精子が口を開くようにして、小胞の中身を放出する (開口分泌; 写真も参照)。出てくるのは、卵子の周りを保護している物質を溶かすための酵素である。その直後に、開いた部分からシュルシュルと突起が伸び出す。これが先体突起と呼ばれるもので、その先端が卵子の細胞膜に結合する。突起の中ではアクチンが向きをそろえて重合

---

#### Focusing on an individual

Ichiro SASE, Hiroshi YOSHIKAWA, Hidetake MIYATA, Kazuhiko KINOSITA, Jr.  
Department of Physics, Faculty of Science and Technology, Keio University

「1個」を見る

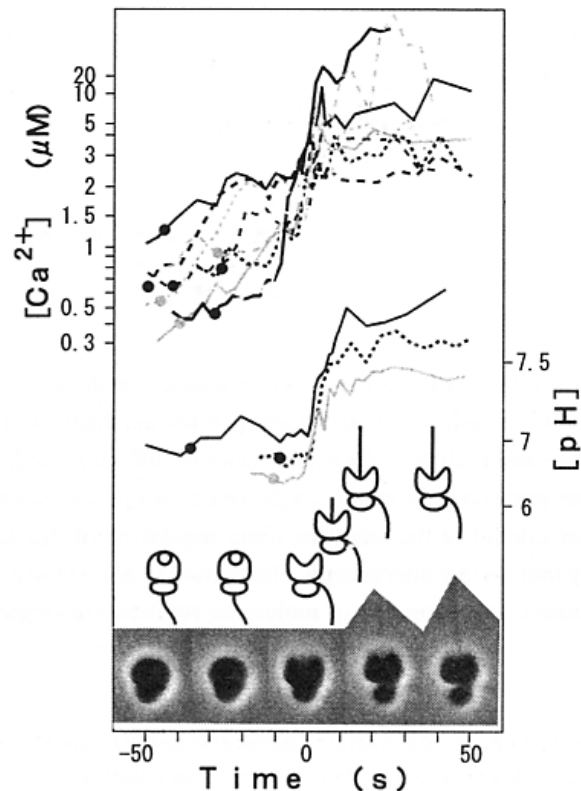


図1 ヒト精子先体反応に伴う細胞内カルシウム濃度変化とpH変化. 各線は、それぞれ別の精子を表す. いずれも、位相差像(写真)から判断した開口分泌の瞬間を時刻0としてプロットした. それぞれ●で示す時刻に、イオノマイシンを加えた. カルシウム濃度はindo-1, pHはSFARF-1を蛍光プローブとして2波長蛍光イメージング(位相差像と同時に)により求めた<sup>3)</sup>. 右側のpHの目盛りはだいたいの目安.

してゆくのである.

イオン感受性蛍光色素を使った種々の実験から、この先体反応においては、精子内のイオン濃度変化が重要な役割を担うことが示唆されている. 卵子でも受精・発生のいろいろな段階をイオンが制御していることが知られており、こちらは細胞が大きいので、卵子1個の中での反応の連鎖をイメージングにより解析する研究がさかんである<sup>1), 2)</sup>. しかし精子ははるかに小さく(ヒトデヤウニで約 $1\mu\text{m}$ ), 蛍光色素を導入しても微弱な蛍光しか得られないため、これまでの研究のほとんどは、精子懸濁液をキュベットに入れて蛍光光度計で測定するというものであった. これでは、 $10^8$ 個にもものぼる精子を同時に観察することになり、それらの平均的振る舞いしかわからない. そこで我々は、超高感度カメラと多画像顕微鏡を用い、1個の精子の形態変化とその中のイオン濃度変化を、同時かつ連続的に観察することを試みた<sup>3)</sup>.

図1では、イオノマイシンという薬物(カルシウムイオノフォア)を使って先体反応を起こさせた. 各曲線は、イオノマイシンを加えた後のカルシウム濃度な

いしpHの変化を、1個1個の精子につき測定した結果である. これらの結果を、イオノマイシン添加の時刻(●)をそろえてプロットしたとすると、先体反応の前後でカルシウム濃度もpHもともに上昇する、という以上のことはわからない. 実際、キュベット内の精子にイオノマイシンを加える実験からは、この程度の情報しか得られなかったのである.

我々の1個1個を見る実験では、各精子が開口分泌を起こす瞬間を位相差像(図1中の写真)から判定できる. この時刻をそろえてプロットしたのが図1である. まずカルシウム濃度変化に注目すると、精子ごとにカルシウム濃度上昇の速度がまちまちであるにも関わらず、いずれも約 $2\mu\text{M}$ という閾値に達したところで開口分泌を起こしたことがわかる. 精子内でのカルシウムセンサーの存在が予想され、 $2\mu\text{M}$ という境界を越えたところで作動すること、センサーの作動から開口分泌に至る反応には1~2秒程度しかかからないこと、などが推察されるのである.

いっぽうpHのほうは、観察したすべての精子において、開口分泌直後に急激な上昇が見られた. 従来の

キュベットの測定では、ゆっくりとした上昇しか報告されていない。イオノマイシン添加から開口分泌までの時間が、精子ごとにばらつくからであろう。図1の結果は、開口分泌がpH上昇の引き金になるという、従来知られていなかった反応連鎖の可能性を示唆するものである。さらに、図1に見られるpHの急激な上昇は、アクチン重合にともなう先体突起の伸長や精子の尾(鞭毛)の運動の活性化と同時に起きており、これらの現象の引き金がpH上昇だという仮説を支持する。

カルシウム濃度に対するはっきりとした閾値の存在、さらに開口分泌に同期した、しかしわずかな遅れをとまう、pHの急上昇など、今回初めて得られた結果がなぜキュベットの測定からは得られなかったか。それは、たとえイオノマイシンをもってしても(卵子との反応でももちろん)、多数の精子の先体反応を完全に同期させることができないからである。生き物は、多かれ少なかれ確率的に振る舞う。個体レベルですら気まぐれは日常茶飯事。これが分子となると、気まぐれは例外でなくルールとなる。

### 3. アクトミオシン分子モーターの素過程 —確率的に動く分子機械—

分子たった1個で立派な働きをするのが、蛋白質でできた分子機械である。といっても、1分子で働くことが直接確認されたのは、いまのところイオンチャンネルと以下に述べる分子モーターの2例だけである。

筋肉からミオシンとアクチンを取り出し、ミオシン分子をガラス上に蒔く。アクチン分子は通常の下では重合して線維構造をとるので、これをミオシン分子の上のせ、エネルギー源としてATPを加える。するとアクチン線維がミオシンの上をリニアモーターのように滑走しはじめる(本特集船津の項参照)。ミオシンとアクチンの界面で何事かが起きて、滑り力が発生するのである。

滑っていくアクチン線維の後端に直径 $1\mu\text{m}$ ほどのプラスチックビーズを付けておき、ビーズを光ピンセットでとらえると、ミオシンと光ピンセットの間でアクチンを介した綱引きが始まる。光ピンセットとは、強力なレーザー光を1点に集光することにより、焦点に向かう引力を発生させるものである。光ピンセットの引力をあらかじめ測っておけば、分子モーターの出す力の大きさがわかる。そればかりか、光ピンセットがビーズのブラウン運動を押さえてくれるおかげで、ビーズのごくわずかな変位、したがってビーズを引っ張っているアクチン線維の微妙な動きを、精密測定できる。我々の場合、ビーズの位相差像の輝度の重心を

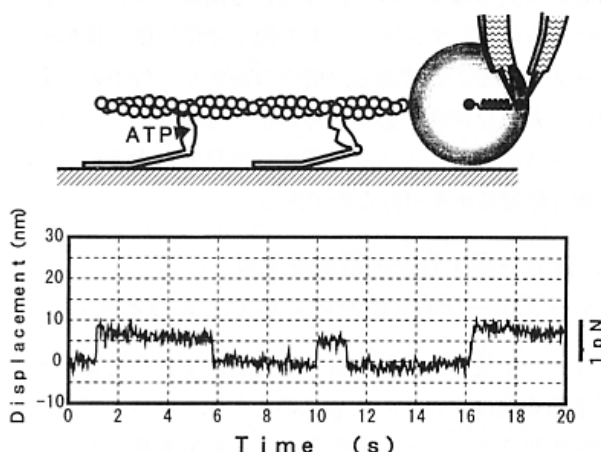


図2 アクトミオシン分子モーターの単位動作。上は、基板上の2個のミオシン分子がアクチン線維を引っ張るところの模式図。アクチンに結合したビーズの変位のトレースが下図。各ミオシン分子には数秒に1回の割合でATPが結合し、そのとき前進ないし後退のステップが刻まれると考えられる(ミオシンがアクチンから離れるだけなら後退)。

計算することにより、ナノメートルオーダー ( $10^{-9}\text{m}$ )の精度を得ている。

アクチンを引っ張るミオシン分子の数を減らしていき、溶液中のATPの濃度も減らしていくと、ついにミオシン1分子がATP1分子を分解したときに起きるアクチンの変位、すなわち分子モーターの「1歩」が見えてくる<sup>5)</sup>。図2に示すように、アクトミオシンモーターの「歩幅」は数ナノメートル、1歩を踏み出すときに出す力は負荷しただが、図の例では1ピコニュートン(0.1ナノグラム重)程度である。

図2のグラフは、単一イオンチャンネルの開閉の時間特性とよく似ている。チャンネルの開閉も分子モーターのステップも、確率的に、ランダムに起きる現象である。何個ものミオシン分子がアクチンにとりついていて、それらを互いに同期させることはできない。したがって、素過程すなわちステップを見るためには、どうしても1個のミオシン分子が働くところを見る必要がある。

図2に見られるステップが、いったいどのようなメカニズムで生じるのかは、まだわかっていない。1つの可能性は、図2の上を示したように、ATPの加水分解にともないミオシンに変形が起き、それがそのままアクチンの変位、すなわちステップになるというものである。この説の当否はともかく、光学顕微鏡にはこのような分子変形をリアルタイムでとらえる能力があることになる。注目したいのは、蛋白質分子に比べて

はるかに大きなビーズを付けたにも関わらず、いや付けたからこそ、ナノメートルの微小変位・微小変形がとらえられることである。慣性の効かない分子の世界では、大きな荷物が必ずしも負担にならない。いっばうビーズのように大きな目印からの信号は大きいので、精密な位置検出が可能なのである。

#### 4. 蛍光色素1分子の回転を見る

##### —プローブも1個だけにしてしまうと—

ひとつを見る、小さなものを見る、生きたまま見る。光学顕微鏡はこれらの要求に応えながら発展してきた。細胞が見えた、分子1個の発生する変位も見えた、しかし、蛋白質分子は直接観察できていない。ナノメートルサイズの蛋白質分子を直接見るのは、やはり難しいのである。そこで相手に印を付けてしまう、できるだけ目立つ印を付けてしまう。しかし相手は分子機械、印が邪魔をしてはいけない。機能を損なっては何もならないし、小さい印ですめばそれにこしたことはない。ぜいたくをいえば、その印から相手のことをもっと知りたい。

暗闇で光る蛍光は、どんなに弱くてもよく目立つ。そして遺伝子工学のおかげで、どんな蛋白質分子にも、機能の邪魔にならないところを選んで少なくとも1分子の蛍光色素を結合させられる。となると、蛍光色素1分子を見ることができると顕微鏡さえ作れば、蛋白質分子が動き回るところを、分子機械が実際に働く現場を、観察できることになる。

蛍光色素1分子から取り出せる光子の数、さらにそのうち何個を検出できるかなどを見積もってみると、ふつうの顕微鏡でも蛍光色素1分子のイメージングが十分可能だという計算になる<sup>6)</sup>。それではどうしてこれまで1分子が見えなかったのかというと、市販の蛍光顕微鏡が、それ自体で蛍光を出してしまうからである。暗闇を背景に浮かび上がるはずの1分子が、顕微鏡本体の発する、あつてはならないはずのイルミネーションにかすんでしまう。昼間に星は見えない理屈である。

そこで我々は、市販の蛍光顕微鏡の徹底的なクリーンアップを試みた。最大のポイントは、不要な迷光が鏡体内で散乱されてそこらじゅうを光らせるのを防ぐことであった。いくつかの工夫の結果、背景光を大幅に減少させることができ、アクチン分子に結合させた蛍光色素テトラメチルローダミンの1分子が、水中を動き回るところを連続観察することに成功した<sup>7)</sup>。たしかに1分子が見えたのだという証明が大切だが、アクチン線維中のすべてのアクチン分子にローダミンを

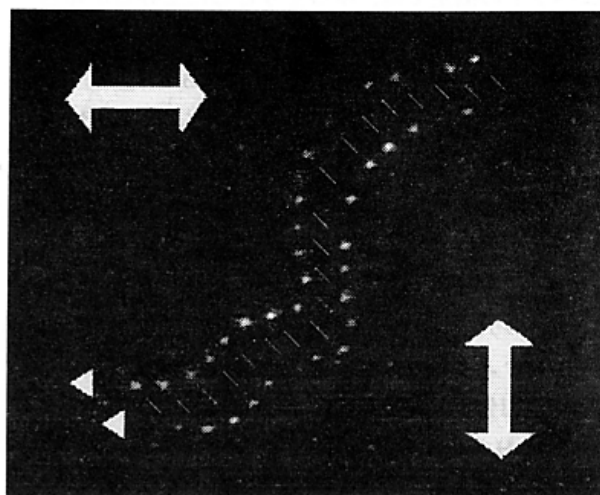


図3 アクチン線維に結合したローダミン1分子の蛍光の偏光イメージ。縦・横両偏光成分(矢印)を同時観察し、それぞれ軌跡に沿って並べた。同時観察した対を、それぞれ斜線で結んである。各像の積算時間は0.27秒。基板上のミオシンは無染色。

結合させると1 $\mu\text{m}$ あたり366個になることがわかっている。この試料を基準としてローダミン1分子あたりの蛍光強度を計算できる。動き回る輝点の多くは、期待される強度で光っていた。

さて図3は、ミオシン上を滑走するアクチン線維に結合したローダミン1分子を連続撮影したものである。ここではもう工夫を加えて、1分子からの蛍光を偏光ビームスプリッターに通し、縦・横の偏光成分に分けて同時観察した。色素分子が縦を向けば縦偏光成分が強くなり、横を向けば横偏光成分が強くなるはずで、図3から、アクチンの滑走にともないローダミンが回転する様子が読みとれる。このローダミンはアクチン分子にしっかりと結合しているのだから、見ているのはアクチン分子の回転である。

本特集で西坂らが述べているように、アクチン線維は前進すると同時に自身の軸の回りに回転しようとする。図3はこの回転を直接とらえたものと考えられる。ミソは、アクチン線維にローダミンをたった1分子しか付けなかったところにある。ふつうやるようにどのアクチン分子にも蛍光プローブを付けてしまうと、線維構造にしたがって回転対称に配置されてしまうから、線維軸回りに回転が起きても見分けがつかないのである。

図3では分子(線維)全体の回転を観察したわけであるが、図2上の模式図のミオシンに蛍光色素を付けておけば、ミオシンの構造変化(曲がり)を直接とらえられる可能性がある。蛋白質分子のいろいろな部位

を選んでプローブ色素を結合させることにより、どこがどのような構造変化を起こすのか、現場で直接見てしまえるというわけである。

## 5. おわりに

気まぐれに、あるいは確率的に、働く細胞や分子を強制的に同期させることも、実は可能である。すでに長い歴史を持つ、緩和法である。たとえば光パルスを用いると、 $10^{-12}$ 秒以内という精度で、そろって反応を開始させることができる。たくさんを同時に反応させられるから、信号/雑音比もだんぜん良い。しかし、緩和法で反応の開始を同期させられたとしても、その後の反応経過まで全部そろえることはできない。連鎖反応だとして、第2段以降はバラバラになってしまう。というわけで、やはり1個を見るのが大事なのである。もちろん1個の観察は精度が悪いから、緩和法と相補う必要がある。

確率的な振る舞いを研究するもう1つの手段は、雑音解析である。平均値の周りの信号の揺らぎを測定・解析する。こちらは相手の数が少ないときに初めて有効な手段だから、1個でも測定できるのならそれで十分、ということになりそうだ。

百聞は一見に如かず、とまではいかないが、やはり「1個」を見ることで「1個だけでは何をやっているのか、1個でどこまでできるのか」が考えられるようになる。

った。もちろん、何を見ているのかに慎重になる必要はある、しかし「1個」が見えてきた、次の仕事は「1個」の側から「システム全体」を見上げることであろう。

## 文 献

- 1) 鈴木慶介, 佐瀬一郎, 田中百合子, 木下一彦 (1993) 化学と工業 **46**, 596-599.
- 2) Suzuki, K., Tanaka, Y., Nakajima, Y., Hirano, K., Itoh, H., Miyata, H., Hayakawa, T. and Kinoshita, K., Jr. (1995) *Biophys. J.* **68**, 739-748.
- 3) Sase, I., Okinaga, T., Hoshi, M., Feigenson, G. W. and Kinoshita, K., Jr. (1995) *J. Cell Biol.* **131**, 963-973.
- 4) Suzuki, N., Miyata, H., Ishiwata, S. and Kinoshita, K., Jr. (1995) *Biophys. J.*, in press.
- 5) Miyata, H., Yoshikawa, H., Hakozaki, H., Suzuki, N., Furuno, T., Ikegami, A., Kinoshita, K., Jr., Nishizaka, T. and Ishiwata, S. (1995) *Biophys. J.* **68**, 286s-290s.
- 6) 宝谷紘一, 木下一彦 (1991) 日本分光学会, 測定法シリーズ21 限界を超える生物顕微鏡 - 見えなぬものを見る -.
- 7) Sase, I., Miyata, H., Corrie, J. E. T., Craik, J. S. and Kinoshita, K., Jr. (1995) *Biophys. J.* **69**, 323-328.

## 広告担当委員より

新年を迎え会誌が一新されると同時に、広告が大幅に増えました。皆様どうお感じでしょうか? ご意見をお寄せください。

ある先輩が「学会の存在意義は会員へのサービスにあり」と言われたのが、耳に残っています。サービスの中身ですが、会員間および会員と外部の情報交換を助けるのが、大きな役目の一つでしょう。広告も、大切な情報だと思のですがいかがでしょうか? (他の学会誌も含めて、まず目を通すのはニュースと広告、という人もいます。サイエンス以外の情報サービスとして、ニュース欄と広告の一層の充実、また重要なデータベースである名簿の毎年発行、などが望まれます。)

情報の流れは、一方通行だとすぐとぎれます。広告を出す側から見ると、「生物物理」の読者がどのような情報を必要としているかが聞けて初めて、対話が成立します。前号の編集室便りに津田さんも書かれているように、巻

末の資料請求FAX用紙や直接連絡などを通して、「生物物理」の読者であることをはっきりさせた上で、何が知りたいか、どんな広告を望むか、をお伝えください。

広告担当運営委員といたしましては、新製品や隠れたヒット商品など、中身の濃い広告の発信をお願いしたいと思います。会員の皆様も、ご存じの企業に、「こんな広告を出していただいけませんか」と働きかけていただけないでしょうか。「新製品コーナー」や、会員による「これは便利」「使ってみたら」といった記事なども企画できればと考えております。皆様のご協力が頼りですので、どうかよろしく願いいたします。

末筆ながら、情報を発信していただいている各企業、流路造りに努力して下さっておられる(株)イー・イー企画、(株)アライズ社および多くの学会員の皆様に、心より感謝いたします。

木下一彦, 豊島陽子